

基于 HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地小茴香饮片质量

朱静平¹, 刘梦云^{1,2,3}, 贾梦雪¹, 李红伟^{1,2,3}, 尹海龙⁴, 尹强^{4*}, 李凯^{1,2,3*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 河南 郑州 450046

3. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 河南 郑州 450046

4. 新疆维吾尔药业有限责任公司, 新疆 乌鲁木齐 830026

摘要: 目的 建立不同产地小茴香 *Foeniculi Fructus* 的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法, 结合化学模式识别法评价不同产地小茴香的质量, 为其进一步研究和开发提供依据。方法 采用 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 检测波长 220 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 0.8 mL/min, 进样量 10 μL。建立小茴香 HPLC 指纹图谱并分析相似度, 同时通过对照品对比指认化学成分并进行定量测定。通过 IBM SPSS Statistics 26 和 SIMCA 14.1 软件进行聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 对小茴香饮片进行质量评价, 筛选差异性标志物。结果 建立了不同产地小茴香 HPLC 指纹图谱, 共标定了 20 个共有色谱峰, 指认出其中 5 个成分; 15 批样品相似度均在 0.952 以上; 聚类分析将 15 批小茴香分为 3 类; PCA 提取了 5 个主成分, 其方差累积贡献率为 91.126%; PCA 结果显示内蒙古产地的小茴香质量最优; OPLS-DA 筛选出小茴香样品中紫丁香苷、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑 4 个质量差异标志物, 其与芦丁 5 种成分的质量分数分别为 0.605~1.036、0.239~0.861、0.186~0.479、2.870~4.784、0.172~0.724 mg/g。结论 建立的小茴香 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法简单、准确、重复性好, 可用于小茴香的质量评价, 为其质量控制提供依据。

关键词: 小茴香; 茴香; HPLC; 指纹图谱; 紫丁香苷; 槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷; 茴香醛; 反式茴香脑; 化学模式识别; 主成分分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)24-8564-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.24.023

Evaluation of quality of *Foeniculi Fructus* from different origins based on HPLC fingerprinting and multi-component quantification combined with chemical pattern recognition method

ZHU Jingping¹, LIU Mengyun^{1,2,3}, JIA Mengxue¹, LI Hongwei^{1,2,3}, YIN Hailong⁴, YIN Qiang⁴, LI Kai^{1,2,3}

1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Zhengzhou 450046, China

3. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

4. Xinjiang Uygur Pharmaceutical Co., Ltd., Urumqi 830026, China

Abstract: Objective The HPLC fingerprints and multi-component content determination methods of *Foeniculi Fructus* from different origins were established, and combined with the chemical pattern recognition method to evaluate the quality of *Foeniculi*

收稿日期: 2024-04-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81873005); 河南省科技研发计划联合基金 (优势学科培育类) 项目 (232301420073); 河南省中医药科学研究专项课题 (2022ZY1177)

作者简介: 朱静平, 女 (彝族), 云南省红河州人, 硕士研究生, 主要从事中药炮制技术及炮制机制研究。E-mail: zhujingping6145@163.com

*通信作者: 尹强 (1981—), 男, 博士, 正高级工程师、正高级经济师, 主要从事中药民族药新药研究。

Tel: (0991)3727587 E-mail: yinqiang@renfu.com.cn

李凯, 男, 河南许昌人, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药炮制研究工作。Tel: (0371)65962746 E-mail: cpulikai@163.com

Fructus from different origins and provide a basis for its further research and development. **Methods** A Zorbax Eclipse XDB-C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, with acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution as the mobile phase and the gradient elution; the detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 30 °C, the volume flow rate was 0.8 mL/min, and injection volume was 10 μL. HPLC fingerprints of fennel were established and analyzed for the degree of similarity. The HPLC fingerprints of *Foeniculi Fructus* were established and analyzed for similarity, and the chemical components were identified by comparison with the control and quantitatively determined. Cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis were performed by IBM SPSS Statistics 26 and SIMCA 14.1 software to evaluate the quality of the *Foeniculi Fructus* and to screen the differentiation markers. **Results** The HPLC fingerprints of *Foeniculi Fructus* from different origins were established, and a total of 20 common chromatographic peaks were calibrated to recognize five components; the similarity of the 15 batches of samples was above 0.952; the cluster analysis divided the 15 batches of *Foeniculi Fructus* into three categories; the principal component analysis extracted five principal components, and the cumulative contribution rate of their variances was 91.126%; the results of the principal component analysis showed that the quality of the cumin from Inner Mongolia was the best; the orthogonal partial least squares-discriminant analysis showed that the quality of *Foeniculi Fructus* from Inner Mongolia was the best. The best; orthogonal partial least squares-discriminant analysis screened four markers of quality difference in *Foeniculi Fructus* samples, namely, linaloside, quercetin-3-*O*-glucuronide, fennel aldehyde, and *trans*-anethole brain, which were 0.605—1.036 mg/g, 0.239—0.861 mg/g, and 0.186—0.479 mg/g, 2.870—4.784 mg/g, respectively, of the five constituents with rutin, 0.172—0.724 mg/g. **Conclusion** The established HPLC fingerprinting and multi-component content determination method for *Foeniculi Fructus* is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality evaluation of *Foeniculi Fructus* and provide the basis for its quality control.

Key words: *Foeniculi Fructus*; *Foeniculum vulgare* Mill.; HPLC fingerprint; syringin; quercetin-3-*O*-glucuronide; anisaldehyde; *trans*-anethole; chemical pattern recognition; principal component analysis

小茴香药材为伞形科植物茴香 *Foeniculum vulgare* Mill. 的干燥成熟果实, 味辛, 性温, 归肝、肾、脾、胃经, 具有散寒止痛、理气和胃的功效, 用于寒疝腹痛、睾丸偏坠、痛经、少腹冷痛、脘腹胀痛、食少吐泻^[1]。历代医药古籍、《中国药典》及各省市炮制规范中记载了多种小茴香的炮制方法, 其中盐小茴香应用最为广泛, 具有暖肾散寒止痛的功效, 用于寒疝腹痛、睾丸偏坠、经寒腹痛^[2]。现代研究发现小茴香主要活性成分为挥发油类 (茴香醛、反式茴香脑等)、黄酮类 (槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、芦丁等)、酚类 (紫丁香苷等) 成分等^[3], 具有调节胃肠机能、保肝、抗菌抗病毒、抗炎镇痛、抗氧化^[4-11]等药理作用, 可作为衡量小茴香饮片质量的重要指标。目前《中国药典》2020 年版以反式茴香脑为小茴香含量测定指标, 但中药具有多靶点、多效应的特点, 故仅以单一化学成分作为其质量评价指标, 难以准确地控制其质量。本实验拟对 15 批不同产地的小茴香饮片进行 HPLC 指纹图谱研究, 并同时测定紫丁香苷、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑及芦丁 5 种成分的含量, 旨在通过多指标、多成分含量测定, 以更精确、更科学的方法综合评价小茴香的质量; 此外, 运用相似度评价分析、聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析 (principal component

analysis, PCA) 与正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 对小茴香进行综合评价, 旨在找出对其质量影响较大的关键性成分, 为其质量控制提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司); Sartorius BT25S 型十万分之一电子分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); FA2104B 型电子分析天平 [上海越平科学仪器 (苏州) 制造有限公司]; TGL-16M 型高速冷冻离心机 (常州金坛良友仪器有限公司); 优普超纯水机 (四川优普超纯科技有限公司); KQ-500DV 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); DZTW 型智能控温电热套 (上海力辰邦西仪器科技有限公司); DLH-200 型粉碎机 (武义祺腾电器有限公司)。

1.2 材料与试剂

对照品芦丁 (批号 MUST-12040302, 质量分数 ≥ 98%)、紫丁香苷 (批号 PRF21051005, 质量分数 ≥ 98%)、反式茴香脑 (批号 Y24N6S6391, 质量分数 ≥ 98%)、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷 (批号 X24O6C4947, 质量分数 ≥ 98%)、茴香醛 (批号 H04J10Z78823, 质量分数 ≥ 98%) 均购自上海源叶

生物科技有限公司；甲醇、磷酸、乙腈均为色谱纯（赛默飞世尔科技有限公司）；水为蒸馏水，其他试剂均为分析纯。

1.3 样品

本研究收集了甘肃、陕西、内蒙古、新疆、广西 5 个产地共 15 批小茴香饮片样品。样品均为小茴香药材按《中国药典》2020 年版“小茴香”项下饮片炮制方法“除去杂质”，炮制制得的相应饮片。所有样品均由河南中医药大学药学院李凯教授鉴定为伞形科植物茴香 *F. vulgare* Mill. 的干燥成熟果实，样品产地来源及批次见表 1。

表 1 小茴香饮片样品信息

Table 1 Information of *Foeniculi Fructus* samples

样品编号	产地	批号
xhx-1	甘肃景泰	230203
xhx-2	甘肃民乐	220901
xhx-3	甘肃民勤	230601
xhx-4	甘肃民乐	220923
xhx-5	甘肃景泰	230201
xhx-6	甘肃民勤	230202
xhx-7	甘肃金塔	230901
xhx-8	陕西汉中	230401
xhx-9	广西玉林	2208017
xhx-10	新疆	230605
xhx-11	新疆	2301046
xhx-12	内蒙古	230801
xhx-13	内蒙古	211018
xhx-14	甘肃玉门	210701
xhx-15	新疆	230705

2 方法与结果

2.1 小茴香 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取紫丁香苷、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑、芦丁对照品适量，加甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中，得质量浓度分别为 1.065、0.520、2.010、2.000、0.708 mg/mL 的单一对照品储备液，取上述对照品储备液适量，用甲醇稀释成一定质量浓度的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取小茴香饮片粉末（过 2 号筛）约 2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 25 mL，称定质量，超声处理（功率 500 W、40 kHz）45 min，放冷，再称定质量，用 50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，离心（转速为 8 000 r/min）15 min，取上清液，滤过，过 0.22 μm 的微孔滤膜，即得。每个样品均平行制备 3 份。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 ZORBAX Eclipse

XDB-C₁₈（250 mm×4.6 mm，5 μm）柱；流动相为乙腈（A）-0.1% 磷酸水（B），梯度洗脱：0~10 min，5%~10% A；10~17 min，10%~17% A；17~21 min，17%~20% A；21~51 min，20%~45% A；51~65 min，45%~85% A；65~75 min，85%~5% A；体积流量 0.8 mL/min；检测波长 220 nm；进样量 10.0 μL；柱温 30 ℃。

2.1.4 精密度试验 取同一批小茴香饮片粉末（编号 xhx-5）1 份，按照“2.1.2”项下方法进行供试品溶液的制备，按照“2.1.3”项下色谱条件连续 6 次进样测定，以紫丁香苷峰为参照峰，计算其色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD，测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.07%，相对峰面积的 RSD 均小于 0.62%，说明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取同一批小茴香饮片粉末（编号 xhx-5）一份，按照“2.1.2”项下的方法进行供试品溶液的制备，按照“2.1.3”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，以紫丁香苷峰为参照峰，计算其色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD，测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.19%，相对峰面积的 RSD 均小于 2.67%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 分别称取同一批小茴香饮片粉末（批号 xhx-5）按照“2.1.2”项下的方法平行制备 6 份样品溶液，按照“2.1.3”项下色谱条件进样分析，以紫丁香苷峰为参照峰，计算其色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD，测得各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.17%，相对峰面积的 RSD 均小于 3.34%，说明该方法重复性良好。

2.1.7 HPLC 指纹图谱的建立及共有峰的指认 取 15 批小茴香饮片，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1.3”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。将所得 15 批不同产地小茴香指纹图谱以 AIA 格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》中进行处理分析，以编号为 xhx-7 样品图谱为参照图谱，时间窗宽度设为 0.1 min，按中位数法生成对照图谱，并进行多点校正和全谱峰匹配。得到各样品 HPLC 图谱叠加图（图 1）。根据建立的小茴香 HPLC 指纹图谱分析结果可知，15 批小茴香的色谱图共匹配出 20 个共有峰，其中 4 号峰（紫丁香苷）峰面积相对较大，分离效果及稳定性较好，保留时间适中，故将其作为参照峰（S）。经对

照品对比, 指出其中 5 种成分, 依次为紫丁香苷(4 号峰)、芦丁(9 号峰)、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷(12 号峰)、茴香醛(17 号峰)和反式茴香脑(19 号峰)。共有模式指纹图如图 2 所示, 对照品色谱图如图 3 所示。20 个共有峰峰面积的 RSD 为 11.02%~60.71%, 说明各产地间成分含量相差较大。

2.1.8 相似度评价 对 15 批小茴香指纹图谱匹

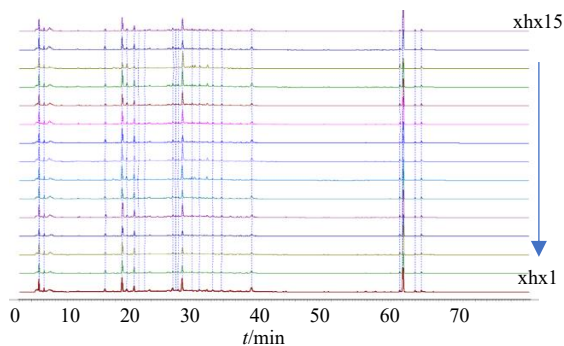


图 1 小茴香样品 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 1 Overlay of HPLC fingerprints of *Foeniculi Fructus*

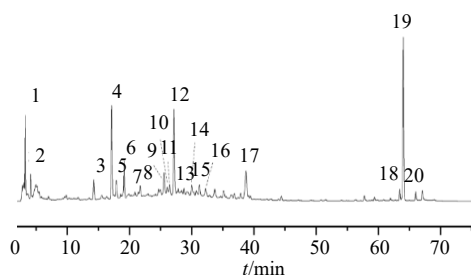
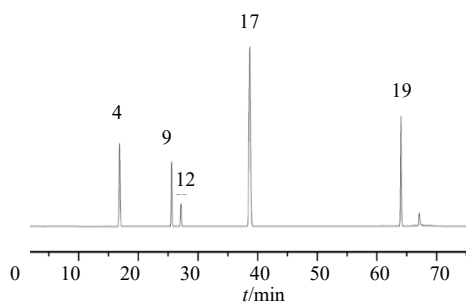


图 2 小茴香指纹图谱共有模式

Fig. 2 Common pattern fingerprint of *Foeniculi Fructus*



4-紫丁香苷; 9-芦丁; 12-槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷; 17-茴香醛; 19-反式茴香脑。
4-syringin; 9-rutin; 12-quercetin-3-*O*-glucuronide; 17-anisaldehyde; 19-*trans*-anethole.

图 3 混合对照品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of mixed control substance

配度结果进行相似度评价, 相似度为 0.952~0.997, 均在 0.9 以上, 相似度较高, 说明不同产地小茴香样品的化学成分一致性较高, 质量较为均一、稳定, 符合指纹图谱的研究要求, 可以用于综合评价小茴香的整体质量, 相似度分析结果见表 2。

表 2 15 批小茴香指纹图谱相似度评价结果

Table 2 Results of similarity evaluation of fingerprint profiles of 15 batches of *Foeniculi Fructus*

编号	相似度	编号	相似度
xhx-1	0.985	xhx-9	0.981
xhx-2	0.978	xhx-10	0.993
xhx-3	0.971	xhx-11	0.991
xhx-4	0.967	xhx-12	0.987
xhx-5	0.997	xhx-13	0.952
xhx-6	0.971	xhx-14	0.970
xhx-7	0.977	xhx-15	0.990
xhx-8	0.982		

2.2 化学模式识别

2.2.1 HCA 以 15 批小茴香样品 HPLC 指纹图谱中 20 个共有峰的峰面积作为变量, 运用 IBM SPSS Statistics 26 统计软件, 采用组间平均数联结法, 以平方欧式距离为测度对小茴香进行 HCA, 结果见图 4。当欧式距离为 13 时, 15 批小茴香样品可被明显聚为 3 类, xhx-1、xhx-2、xhx-4、xhx-5、xhx-7、xhx-9~11、xhx-14、xhx-15 聚为第 1 类, xhx-3、xhx-6 聚为第 2 类, xhx-8、xhx-12、xhx-13 聚为第 3 类。第 1 类样品来自甘肃省景泰县、甘肃省民乐县、甘肃省金塔县、甘肃省玉门市、新疆维吾尔自治区、广西省玉林市, 第 2 类样品均来自

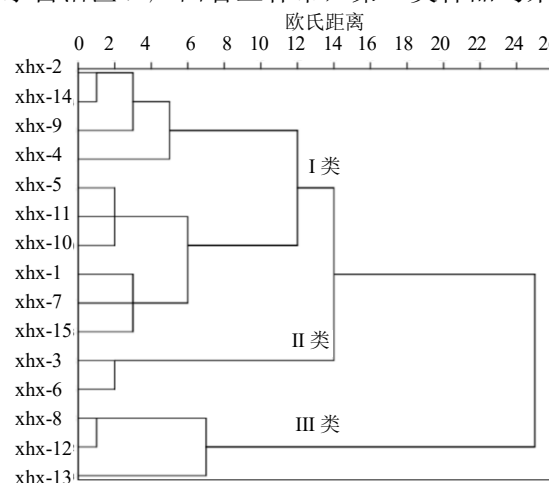


图 4 15 批小茴香样品 HCA 图

Fig. 4 HCA of 15 batches of *Foeniculi Fructus* samples

甘肃省民勤县，第 3 类样品来自陕西省汉中市、内蒙古自治区。从 HCA 结果可知，小茴香饮片分类存在产地交叉现象；新疆与甘肃小茴香饮片质量较为接近，这可能与新疆和甘肃接壤、经纬度差较小、环境气候条件相似等因素有关；第 2 类样品采集时间为同一年且来源于同一个地区，表明同一时间、同一地区小茴香在质量上较为相似；甘肃境内不同产地的小茴香质量差别较大，这可能与其生长环境、采收加工方式等因素有关。

2.2.2 PCA 以 15 批小茴香指纹图谱中 20 个共有峰的峰面积为变量，运用 IBM SPSS Statistics 26 软件对上述的 15×20 阶数据矩阵进行 PCA，以主成分特征值>1 为提取标准并生成因子得分系数矩阵。以特征值及方差累积贡献率作为确定主成分个数的选择依据，共有 5 个主成分的特征值大于 1，其方差累积贡献率为 91.126%，说明这 5 个主成分可解释原有变量 91.126%的信息，在一定程度上可以代替指纹图谱 20 个共有峰来评价小茴香样品的质量。特征值及贡献率见表 3。

因子载荷矩阵反映了各主成分与 20 个共有峰即原始变量之间的相关系数，结果见表 4，第 1 主成分主要反映了色谱峰 1、2、4（紫丁香苷）、5、8、9（芦丁）、11、12（槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷）、

表 3 特征值及方差贡献率			
Table 3 Eigenvalue and variance contribution rate			
主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	8.228	41.141	41.141
2	6.005	30.027	71.168
3	1.768	8.841	80.009
4	1.211	6.053	86.062
5	1.013	5.064	91.126

14、17（茴香醛）、18 的信息，第 2 主成分主要反映了色谱峰 3、6、7、10、15、20 的信息，第 3 主成分主要反映了色谱峰 13 的信息，第 4 主成分主要反映了色谱峰 16 的信息，第 5 主成分主要反映了色谱峰 19（反式茴香脑）的信息，这些成分是影响小茴香饮片质量的重要因素。

运用 IBM SPSS Statistics 26 软件计算 15 批小茴香样品的主成分得分，以各主成分对应的贡献率为权重计算综合得分，并进行排序，以此评价各产地小茴香的质量，结果见表 5。结果表明，xhx-12、xhx-8、xhx-10 3 个批次小茴香样品的综合得分位居前 3，xhx-9、xhx-4 样品的综合得分最低，说明 xhx-12、xhx-8、xhx-10 这 3 个批次小茴香样品质量较好，xhx-9 和 xhx-4 质量较差。

表 4 因子载荷矩阵
Table 4 Factor loading matrix

共有峰	载荷				
	因子 1	因子 2	因子 3	因子 4	因子 5
1	0.839	0.332	0.215	-0.071	0.248
2	0.857	0.123	0.305	0.059	0.072
3	-0.303	0.818	-0.447	-0.020	0.009
4（紫丁香苷）	0.786	-0.217	-0.418	0.285	-0.025
5	0.864	-0.386	-0.059	0.136	-0.211
6	-0.329	0.770	0.066	0.446	0.181
7	0.374	0.695	-0.006	-0.259	0.197
8	0.816	0.551	-0.037	0.008	0.024
9（芦丁）	0.734	0.126	-0.495	-0.382	0.037
10	0.386	0.657	0.363	-0.276	-0.277
11	0.656	0.629	-0.171	-0.039	-0.175
12（槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷）	0.928	-0.063	0.050	0.151	-0.167
13	0.513	-0.533	0.577	0.152	-0.240
14	0.939	-0.179	-0.070	0.076	-0.212
15	0.165	0.918	-0.169	0.214	0.053
16	0.101	0.746	0.202	0.584	-0.038
17（茴香醛）	0.751	-0.300	-0.436	0.028	0.061
18	0.602	-0.700	0.028	-0.001	0.283
19（反式茴香脑）	0.565	-0.010	0.343	-0.084	0.671
20	0.113	0.704	0.347	-0.408	-0.228

表 5 15 批小茴香的主成分因子得分和排序

Table 5 Principal component factor score and ranking of 15 batches of *Foeniculi Fructus*

样品编号	得分						排序
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5	综合	
xhx-1	0.890	1.351	-0.895	0.677	-0.106	0.728	4
xhx-2	-2.369	0.394	-1.169	0.411	0.287	-0.920	12
xhx-3	-2.833	-0.617	0.629	-1.312	1.261	-1.311	13
xhx-4	-5.570	-3.054	-1.359	-2.174	-0.106	-3.466	15
xhx-5	-0.845	0.535	0.214	0.677	0.358	-0.109	9
xhx-6	-0.030	1.422	1.149	-0.268	2.063	0.604	5
xhx-7	-0.123	-2.632	1.741	0.586	-0.440	-0.674	11
xhx-8	2.596	0.856	-1.107	1.695	1.185	1.390	2
xhx-9	-3.278	0.399	-2.008	0.428	-0.799	-1.421	14
xhx-10	1.837	1.641	1.572	-0.373	-0.195	1.355	3
xhx-11	0.314	0.126	1.155	-0.771	-1.247	0.159	8
xhx-12	4.914	3.659	0.167	2.374	-0.337	3.262	1
xhx-13	4.866	-6.092	0.835	-0.278	0.195	0.240	7
xhx-14	-0.472	0.800	-1.208	-0.840	-0.091	-0.116	10
xhx-15	0.104	1.211	0.284	-0.832	-2.028	0.278	6

2.2.3 OPLS-DA 为了更好地分析不同批次小茴香样本之间的差异和寻找各批次含量之间的差异性标志化合物,将 15 批小茴香样品 20 个共有峰面积导入 SIMCA 14.1 软件中,进行 OPLS-DA 建模分析,经分析生成散点得分图,见图 5。由得分图可知,内蒙古的小茴香均分布在第 3 象限,甘肃的小茴香分布在第 1、4 象限,新疆的小茴香分布在第 1、2 象限,陕西的小茴香分布在第 2 象限,广西的小茴香分布第 4 象限,但同产地的小茴香分布离散程度较大,说明各样品之间质量存在较大差异。变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值是筛选差异化合物的指标, VIP 值越高,对组间差异的影响越大^[12]。为进一步筛选引起小茴香样品之间差异的标志性成分,通过对 VIP 值进行分析,得到差异性标记物的 VIP 得分图,见图 6,以 VIP 值>1 为阈值,筛选出了 7 个变量,按 VIP 值的大小依次排序为峰 12(槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷)、19(反式茴香脑)、4(紫丁香苷)、17(茴香醛)、1、5、13,这 7 个成分是影响各批次小茴香样品质量差异的标志性成分,在小茴香质量评价中起到了重要作用,应重点关注上述成分的含量变化。而 9 号峰为芦丁,但 9 号峰 VIP 值<1,基于本研究样本,提示它可能不是小茴香质量差异的主要成分。

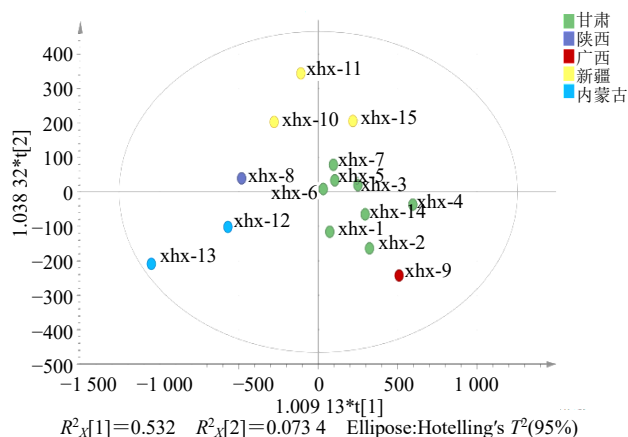


图 5 15 批小茴香的 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score chart of 15 batches of *Foeniculi Fructus*

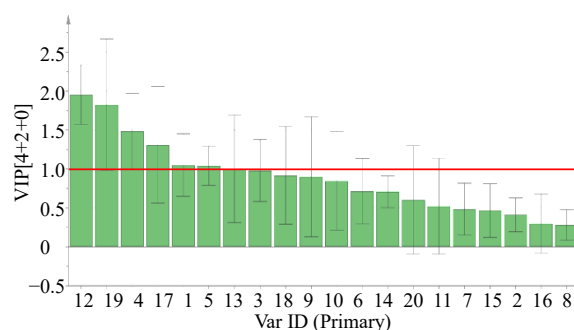


图 6 小茴香 20 个色谱峰的 VIP 得分图

Fig. 6 VIP score chart of 20 chromatographic peaks of *Foeniculi Fructus*

2.3 小茴香 HPLC 多成分含量测定

为进一步分析、评价小茴香饮片质量的差异性，建立了小茴香多成分含量测定方法，对紫丁香苷、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑 4 个差异性标志物及 VIP 值大于 0.8 的芦丁进行含量测定。

2.3.1 色谱条件及溶液的制备 同“2.1.1”“2.1.2”“2.1.3”项。

2.3.2 线性关系考察 取紫丁香苷、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑和芦丁对照品适

量，加入甲醇分别配制成含紫丁香苷 290.704 μg/mL、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷 83.301 μg/mL、茴香醛 815.650 μg/mL、反式茴香脑 771.303 μg/mL、芦丁 411.302 μg/mL 的单一对照品储备液。分别精密吸取各对照品储备液适量，逐级稀释配制 7 个系列混合对照品溶液，按照“2.1.3”项下色谱条件进样分析，以进样质量浓度为横坐标(*X*)，峰面积为纵坐标(*Y*)，进行回归分析，绘制各组分标准曲线，计算回归方程及相关系数，结果如表 6 所示。结果表明，各成分在各自质量浓度范围内线性关系良好。

表 6 小茴香中 5 个成分的线性关系考察结果

Table 6 Results of linear relationship for five components of *Foeniculi Fructus*

化学成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
紫丁香苷	$Y=62\,725\,X+19.609$	1.000 0	2.271~290.704
芦丁	$Y=21\,185\,X+34.477$	0.999 8	3.213~411.302
槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	$Y=77\,464\,X+21.632$	0.999 8	0.650~83.301
茴香醛	$Y=63\,622\,X+8.624$	0.999 9	12.744~407.830
反式茴香脑	$Y=22\,728\,X+328.71$	0.999 3	6.025~771.303

2.3.3 精密度试验 取同一批小茴香粉末（编号 xhx-2）1 份，按照“2.1.2”项下方法进行供试品溶液的制备，按照“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次，计算各待测色谱峰面积 RSD 值，结果显示，紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑峰面积的 RSD 分别为 0.34%、0.57%、0.09%、0.62%、0.27%，说明仪器的精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批小茴香粉末（编号 xhx-2），按照“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，按照“2.1.3”项下色谱条件进样测定，计算各待测成分的质量分数及 RSD 值，结果显示，紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑质量分数的平均值分别为 0.839、0.362、0.210、0.406、3.273 mg/g，RSD 分别为 3.34%、2.48%、3.04%、1.84%、2.18%，表明该方法的重复性良好。

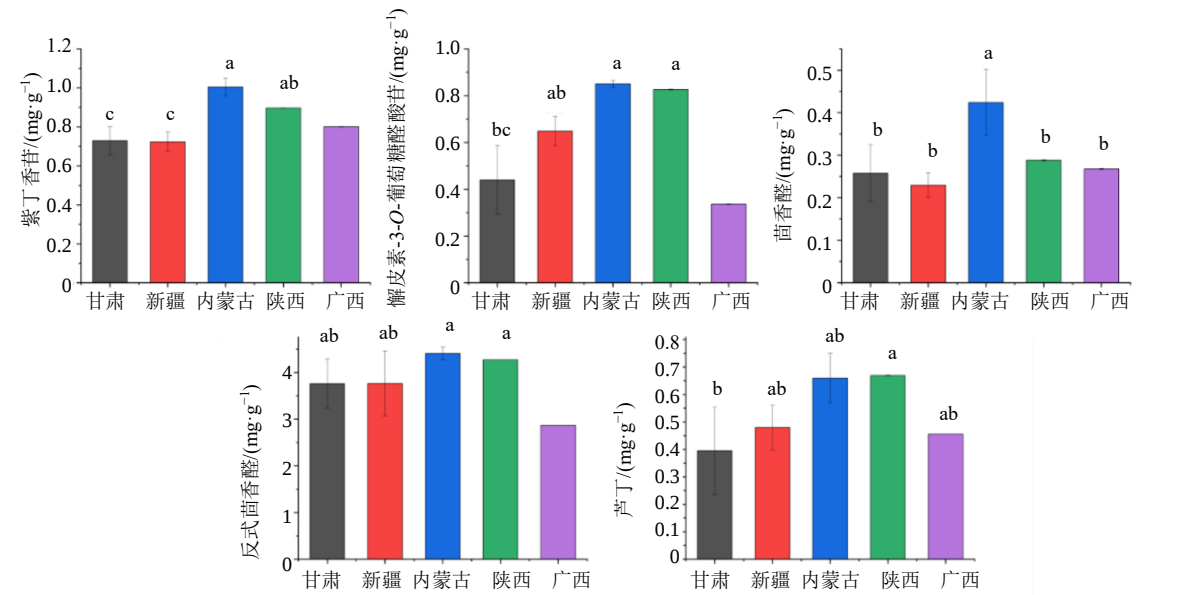
2.3.5 稳定性试验 取同一批小茴香粉末（编号 xhx-2）1 份，按照“2.1.2”项下方法进行供试品溶液的制备，于室温下放置 2、4、8、12、16、24 h，按照“2.1.3”项下色谱条件进样测定，计算各待测色谱峰面积 RSD 值，结果显示，紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑峰面积的 RSD 分别为 0.69%、2.19%、1.25%、0.55%、2.67%，结果表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已测定的同一批次（编号 xhx-14）小茴香样品 2.0 g，分别精密加入适量对照品，按照“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定，计算各成分的加样回收率，结果紫丁香苷、芦丁、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑的平均加样回收率分别为 101.60%、102.15%、95.38%、97.39%、97.16%，RSD 分别为 0.49%、0.82%、0.63%、0.46%、0.81%，表明该方法的准确度良好。

2.3.7 样品含量测定及数据分析 取 15 批市售小茴香饮片，按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1.3”项下色谱条件进样分析并计算样品中 5 种成分的含量，测定结果见表 7。紫丁香苷为 0.605~1.036 mg/g，均值为 0.780 mg/g，最高为内蒙古产地；芦丁为 0.172~0.724 mg/g，均值为 0.469 mg/g，最高为内蒙古产地；槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷为 0.239~0.861 mg/g，均值为 0.555 mg/g，最高为内蒙古产地；茴香醛为 0.186~0.479 mg/g，平均值为 0.277 mg/g，最高为内蒙古产地；反式茴香脑为 2.870~4.784 mg/g，均值为 3.824 mg/g，最高为甘肃民勤产地。通过分析含量测定结果柱形图（图 7），可以看到 VIP 值大于 1 的 4 个差异性成分（紫丁香苷、槲皮素-3-*O*-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式

表 7 15 批次小茴香样品中 5 个成分含量测定结果

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	紫丁香苷	芦丁	槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷	茴香醛	反式茴香脑
xhx-1	0.786	0.639	0.601	0.394	3.542
xhx-2	0.795	0.379	0.357	0.223	3.535
xhx-3	0.657	0.326	0.294	0.192	4.303
xhx-4	0.605	0.222	0.239	0.186	3.280
xhx-5	0.749	0.406	0.574	0.232	3.880
xhx-6	0.671	0.445	0.398	0.275	4.784
xhx-7	0.803	0.172	0.630	0.284	3.392
xhx-8	0.896	0.669	0.826	0.288	4.273
xhx-9	0.801	0.456	0.336	0.268	2.870
xhx-10	0.764	0.526	0.681	0.256	4.372
xhx-11	0.667	0.385	0.688	0.199	3.920
xhx-12	0.973	0.596	0.861	0.369	4.312
xhx-13	1.036	0.724	0.840	0.479	4.509
xhx-14	0.762	0.568	0.424	0.274	3.379
xhx-15	0.738	0.527	0.576	0.234	3.005



不同标记字母的数据表示它们之间存在显著差异， $P < 0.05$ 。
 Different labeled letters indicate significant differences between them, $P < 0.05$.

图 7 5 个指标成分含量测定柱形图

Fig. 7 Content determination bar graph of five index components

茴香脑) 的含量在不同产地间存在显著差异，其中紫丁香苷、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷和茴香醛 3 个成分均为内蒙古产地平均质量分数最高，芦丁在不同产地批次样本间也存在显著差异，但其 VIP 值小于 1。故基于本研究结果，可将紫丁香

苷、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑 4 种指标成分作为评价小茴香质量差异潜在的标志成分。

3 讨论

本实验制备样品时考察了不同提取方式（超

声、加热回流),不同提取溶剂(100%、80%、60%、50%、30%甲醇),不同的提取时间(30、45、60 min),发现用 50%甲醇超声提取 45 min 提取的效果最好。实验比较了不同流动相与添加剂(甲醇-0.1%磷酸水、甲醇-0.1%甲酸水、甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.1%甲酸水)、柱温(25、30、35 °C)、体积流量(0.6、0.8、1.0 mL/min)下各色谱峰的峰数、峰响应和分离度,优化后的结果表明,在提取溶剂为 50%甲醇,乙腈-0.1%磷酸水为流动相,30 °C 柱温,0.8 mL/min 下所得色谱峰的分离效果较好、分离度高。本研究在色谱条件优化过程中,采用二极管阵列检测器(DAD)对小茴香供试品溶液在 190~800 nm 紫外可见光全波长扫描,结果表明 220 nm 下的色谱峰数量较多,色谱峰分离度及峰型较好,基线平稳,较为适合指纹图谱的研究,且能兼顾指标性成分的含量测定,故选择 220 nm 作为检测波长。

本实验对 15 批不同产地小茴香指纹图谱进行研究,结合化学模式识别法分析,更加全面客观的评价小茴香的质量。研究发现不同产地的小茴香化学成分组成较为相似,但各批次样品之间化学成分含量存在一定差异。聚类分析结果显示,小茴香样品聚为 3 类,大部分甘肃、新疆和广西的样品聚为一类,而甘肃省民勤县样品单独聚为一类,内蒙古、陕西样品聚为一类,存在产地交叉现象,且同一产地、不同产地小茴香饮片质量均存在差异。主成分分析结果表明产地为内蒙古和陕西的小茴香质量较好,其与种植地点、气候、生长环境关系较大。小茴香喜湿润凉爽气候^[13],因其适应性极强,各省份均有人工栽培或野生分布,其适宜在土壤结构通透性强的沙瓤土或轻沙瓤土上种植,目前主产地在西北地区的内蒙古、山西、甘肃、宁夏,以及东北地区的辽宁,此外,新疆、陕西、广西等地也有栽培^[14-17]。海拔高的山区、丘陵栽培的小茴香比海拔低的高温地区结果率高,病虫害少且不易徒长茎叶,质量较佳^[18]。

OPLS-DA 结果表明槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、反式茴香脑、紫丁香苷、茴香醛和未知成分峰 1、5、13 是影响小茴香质量的主要因素,未知成分有待后续进一步研究指认。含量测定结果表明紫丁香苷、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、茴香醛、反式茴香脑、芦丁的含量在不同产地间存在显著差异,其中除芦丁为陕西产地小茴香含量最高外,其他 4 个

成分均为内蒙古产地小茴香平均含量最高,与 PCA 和 OPLS-DA 结果一致;内蒙古及陕西的小茴香各成分相对含量均处于较高水平。上述 5 种成分是影响小茴香质量的重要因素,研究发现反式茴香脑、茴香醛等挥发油类是小茴香的主要抑菌成分^[19-20],且具有良好的护肝效果,尤其在抗肝纤维化与抗肝肾毒性方面,多数研究认为这可能与小茴香挥发油能抑制肝脏内脂质过氧化、增加胶原的降解有关^[3]。槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、紫丁香苷、芦丁等小茴香的黄酮类成分具有抗氧化作用,且稳定性较强^[21-22]。结合含量测定方法学研究,5 种成分在同一色谱条件下,色谱峰与相邻色谱峰分离度均大于 1.5,理论塔板数均大于 10 000,因此此 5 种成分作为小茴香质量控制的指标性成分。

本研究建立了不同产地小茴香的 HPLC 指纹图谱,结合化学模式识别法对不同产地的小茴香饮片质量进行了评价,并基于该方法同时测定了小茴香中 5 种指标成分的含量,有效补充了关于不同产地小茴香有效成分分析方向的空缺。所建立方法可清晰反映小茴香中主要成分的特征,方法简便、准确、重复性好,可为小茴香药材及饮片的整体质量评价和小茴香质量标准的提升提供参考。建议在小茴香质量标准中增加指纹图谱鉴别,将紫丁香苷、槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸苷、茴香醛等成分增列为小茴香质量控制的指标性成分,以更好地控制小茴香的质量和保证用药安全。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 47-48.
- [2] 董维茂,朱奎霖,杨兴,等. 盐炙小茴香醋酸乙酯部位化学成分及抗酪氨酸酶活性研究 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 7967-7976.
- [3] 刘昆言,禹双双,刘琪龙,等. 小茴香研究进展 [J]. 农产品加工, 2020(17): 67-73.
- [4] 何玉琨,刘权焰,刘志苏. 快速康复外科中小茴香热敷对胃肠吻合术后胃肠功能恢复的影响 [J]. 武汉大学学报: 医学版, 2017, 38(5): 828-832.
- [5] Asano T, Aida, Suemasu S, *et al.* Anethole restores delayed gastric emptying and impaired gastric accommodation in rodents [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(1): 125-130.
- [6] 钦传辉,宾菊兰. 小茴香热敷对腹腔镜结直肠癌根治术后胃肠功能恢复的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(20): 92-95.

- [7] 杨宏武, 李亮, 唐晓勇. 茴香枳术汤对粘连性肠梗阻模型大鼠血浆 NO、DAO 的影响 [J]. 西部中医药, 2013, 26(2): 31-33.
- [8] Mostafa D M, Abd El-Alim S H, Asfour M H, *et al.* Transdermal fennel essential oil nanoemulsions with promising hepatic dysfunction healing effect: *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Pharm Dev Technol*, 2019, 24(6): 729-738.
- [9] Al-Amoudi W M. Protective effects of fennel oil extract against sodium valproate-induced hepatorenal damage in albino rats [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2017, 24(4): 915-924.
- [10] 陈佳丽, 王可, 赵敏, 等. 香辛料对烧鸡中腐败菌抑制效果的研究 [J]. 肉类工业, 2018(10): 28-32.
- [11] 吐尼牙孜再兰甫古丽. 小茴香挥发油的抗炎镇痛作用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(77): 179.
- [12] 王姿杨, 邢耀莹, 付文芮, 等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别和多成分定量不同产地甘松的质量评价 [J]. 中草药, 2024, 55(3): 956-968.
- [13] 李述成. 海原县小茴香产业发展现状及制约因素分析 [J]. 宁夏农林科技, 2007, 48(6): 43.
- [14] 高方胜, 王明友. 单茬茴香新品种德丰的选育 [J]. 长江蔬菜, 2011(22): 21-22.
- [15] 任安祥, 王羽梅. 复合盐处理对茴香发芽及幼苗生长的影响 [J]. 韶关学院学报, 2007, 28(3): 103-106.
- [16] 刘菊生, 黄德华. 小茴香的耐盐性及耐盐品种的选择 [J]. 中药材科技, 1982(4): 7-9.
- [17] 雷茜, 张欣, 贝盏临. 宁夏海原小茴香细胞学特性研究 [J]. 广东农业科学, 2011, 38(17): 106-108.
- [18] 王晓敏, 李军, 高艳明, 等. 茴香的研究进展 [J]. 河北农业科学, 2013, 17(5): 37-40.
- [19] 蒋军辉, 徐小娜, 杨慧仙, 等. GC-MS 结合直观推导式演进特征投影法(HELP)分析大茴香和小茴香挥发性化学成分 [J]. 南华大学学报: 自然科学版, 2011, 25(4): 91-96.
- [20] 谢敏华, 陈丽. 小茴香抗菌与抗氧化作用研究进展 [J]. 中国调味品, 2012, 37(10): 15-17.
- [21] 郭佳, 魁永忠, 夏泱斌, 等. 不同品种小茴香果实挥发性成分、多酚、黄酮含量及抗氧化性比较分析 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(8): 215-224.
- [22] Roby M H H, Sarhan M A, Selim K A H, *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) [J]. *Ind Crops Prod*, 2013, 44: 437-445.

[责任编辑 时圣明]